

Verification of Translation

U.S. Patent Application No. 09/913,874


Title of the Invention: NOVEL ENZYME

I, Yumi DOI, whose full post office address is IKEUCHI · SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS, 26th Floor, OAP Tower, 8-30, Tenmabashi 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-6026, Japan, am the translator of the documents attached and I state that the following is a true translation to the best of my knowledge and belief of JP 50(1975)-19628 B.

At Osaka, Japan

DATED this November 8, 2001

Signature of the translator

  
Yumi DOI

Partial Translation of  
JP 50(1975)-19628 B

- 5 Publication Date : July 8, 1975  
Application No. : 44(1969)-74186  
Application Date : September 17, 1969  
Applicant : SUMITOMO CHEMICAL CO., LTD.
- 10 Title of the Invention : METHOD OF PRODUCING PROTEASE

Translation of Column 1, lines 18 to 22

- 15 The present invention relates generally to a method of producing protease, and more particularly, to a method comprising the steps of culturing *Pseudomonas aeruginosa* in a natural medium containing an appropriate nutrient under aerobic conditions and separating a novel enzyme, protease B-5, from the resultant culture solution.

20 Translation of Column 4, lines 18 to 33

Ability to degrade protein

- The ability of the enzyme according to the present invention, protease B-5, to degrade various proteins (casein, hemoglobin, bovine serum albumin, and keratin) was compared with that of trypsin. The result is  
25 shown in the following Table.

	trypsin	protease B-5
casein	350 unit/mg	1530 unit/mg
hemoglobin	307	632
albumin	368	518
keratin	134	375

- It is also to be noted that, when examined by the plating method, the enzyme of the invention does not exhibit the ability to decompose elastin but  
30 *does* exhibit the ability to decompose orcein- elastin. The enzyme of the invention decomposes neither collagen nor L- leucine amide. However, the enzyme of the invention decomposes poly-L- lidine, thereby forming di-L- lidine, tetra- L- lidine, etc.

⑤ Int. Cl.<sup>2</sup>.  
C 07 G 7/028  
C 12 D 13/10

⑥ 日本分類  
36(2)C 3

⑦ 日本国特許庁

⑧ 特許出願公告

昭50-19628

## 特 許 公 報

⑨ 公告 昭和50年(1975)7月8日

庁内整理番号 7235-49

発明の数 1

(全 5 頁)

1

### ⑩ プロテアーゼの製造法

- ⑪ 特 願 昭44-74186  
⑫ 出 願 昭44(1969)9月17日  
⑬ 発 明 者 荻野重男  
芦屋市楠町15の10  
同 和田決夫  
豊中市曾根東町2の10の25  
⑭ 出 願 人 住友化学工業株式会社  
大阪市東区北浜5の15  
⑮ 代 理 人 弁護士 沢浦雪男

### 図面の簡単な説明

第1図は本発明より得られるプロテアーゼB-5のPH活性曲線、第2図はそのPH安定性、第3図はその耐熱性を示す。

### 発明の詳細な説明

本発明はプロテアーゼの製法に関し、詳しくは、シユードモナス・エルギノーザを適当な栄養源を含有する天然培地に好氣的条件下で培養し、その培養液から新規なプロテアーゼB-5を分離することを特徴とするものである。

従来プロテアーゼ生産菌としては、細菌類、酵母類、放線菌類、カビ類が知られていて、そのうち細菌類ではバシラス・サチリス(*Bacillus subtilis*)の生産する酵素、シユードモナス・エルギノーザ(*Pseudomonas aeruginosa*)の生産する酵素がよく知られている。ことに後者すなわちシユードモナス・エルギノーザの生産するプロテアーゼは、モリハラらの詳細な研究があり(ビオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクト第73巻第113~124頁(1963)、同じく第73巻第125~131頁(1963)、同じく第92巻第351~360頁(1964)、同じく第92巻第361~366頁(1964)、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー 第240巻第3295~3304頁(1965);アーカイブズ・

2

オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジクス 第120巻第68~78頁(1967);ジャーナル・オブ・バクテリオロジー 第88巻第745~757頁(1964))、これらによれば、シユードモナス・エルギノーザの分泌するプロテアーゼは3種類あり、その至適PHは、6.5, 8.0, 10.0で、それぞれを中性、セミアルカリ性、アルカリ性プロテアーゼとし、セミアルカリ性プロテアーゼはエラスターゼ活性をも有している。

またそれぞれの分子量は、セミアルカリ性プロテアーゼが39500、アルカリ性プロテアーゼは48400である。

ところで本発明は本発明者らにより新たに分離同定されたシユードモナス・エルギノーザ・B-5株(工業技術院微生物工業技術研究所寄託番号第895号)(が生産する、モリハラ等により発見された前記プロテアーゼとは明らかに異なるところの新規プロテアーゼB-5の製法に関するものである。

なお、本酵素の新規性については、酵素学的性状の項に詳述する。

シユードモナス・エルギノーザB-5株(以下B-5株と略称する)を培養してプロテアーゼB-5を採取するためには、栄養源として、細菌類の培養に常用される天然培地ならばいずれでも使用でき、たとえば、炭素源としては、ブドウ糖、グリセリンなど、窒素源としては、ペプトン、コーンステイブリーカー、肉エキス、酵母エキスなどさらには、食塩、リン酸塩、炭酸カルシウム、塩化カルシウムなどが使用される。培地のPHは、中性付近、温度28~37で前後が望ましい。培養にあたっては、通気攪拌培養するのが良好な結果を与える。

発酵母液からプロテアーゼB-5を採取する方法としては、一般に酵素類の採取方法として使用される方法ならいずれでも適用可能である。たと

3

例えば培養液を硫酸アンモンで、飽和度0.6~0.8にするかあるいはアセトン、メタノールのごとき有機溶媒を、最終濃度65~75%程度になる様に加えると、粗酵素が沈殿する。プロテアーゼB-5の採取にあたつては、粘質物を同時に生産するので、これを除去すると精製は極度に進歩する。

たとえば、培養液に硫酸を加えて沈殿させた粗酵素を、適当な緩衝液たとえば、0.05Mトリスバッファー(PH 8.6)に溶解し、少量のアセ

トンの存在下塩化カルシウムの添加により、酵素を沈殿させることなく粘質物のみを沈殿除去することができる。

ここに得た粗酵素液に、さらにアセトンを加えて、酵素を析出させ、これを適当な方法たとえば、15速心分離により採取し、適当な緩衝液たとえば0.05Mトリスバッファー(PH 8.6)の少量に溶解し、冷室に放置すれば、針状結晶が析出してくる。この様にして得られた酵素をさらに適当な溶媒から再結晶するとさらに精製でき、電気泳動的に均一な酵素蛋白が得られ、これは下記のような酵素学的性状を有する。

なお、活性の測定はカゼインを基質として、PH 8.6、反応温度35℃、反応時間20分間として、その場合の酸可溶性物質の280mμの吸光度を測定し、1分間に吸光度 $1 \times 10^{-3}$ だけ増加する酵素量を1単位とした。特記するものの他はすべてこの条件にて測定した。

#### 作用至適PH

本酵素を各種のPH溶液(PH 6.0~6.0はリン酸緩衝液、PH 8.0~10.0はグリシン苛性ソーダ緩衝液を使用する。)中において、カゼインを基質にして活性を測定し、第1図のようなPH活性曲線を得た。本酵素はPH 8~9にその至適PHを有する。

#### PH安定性

本酵素を各種のPH溶液(PH 3はグリシン-塩酸緩衝液、PH 4~5はクエン酸緩衝液、PH 6~8はリン酸緩衝液、PH 9~10はグリシン苛性ソーダ緩衝液、PH 11はホウ砂-炭酸ソーダ緩衝液、PH 12はホウ砂-苛性ソーダ緩衝液を使用する。)に加え、20時間30℃に放置した後、各溶液のPHを8.6とし、その残存活性を測定したところ第2図のような結果を得た。これ

4

により本酵素はPH 6~9において、安定であることがわかる。

#### 耐熱性

本酵素をPH 8.6のトリス緩衝液中30~80℃の各恒温槽に10分間放置した後、残存活性を測定したところ、第3図のような結果を得た。これより本酵素は耐熱性が強く、55℃までは安定で、60℃でもほとんど活性を消失しないことがわかる。

#### 作用至適温度

本酵素の作用至適温度は65~70℃である。

#### 阻害剤の影響

本酵素は、エチレンジアミンテトラ酢酸塩により、顕著に阻害され、また重金属イオンの銀イオン、銅イオン、水銀イオン等で阻害されるが大豆トリブシンインヒビターには阻害されず、一種の金属酵素と推定される。

#### 蛋白質分解力

各種蛋白(カゼイン、ヘモグロビン、ボバイン、シーラムアルブミン、ケラチン)に対する分解能を、トリブシンと比較した結果は次のとおりである。

	トリブシン	本 酵 素
カゼイン	350単位/μg	1530単位/μg
ヘモグロビン	307	632
アルブミン	368	518
ケラチン	134	375

なおエラスチン分解能は平板法では認められな  
いが、オルセイン-エラスチンは分解される。またコラーゲンは、本酵素によつては分解されず、  
L-ロイシンアミドも分解されない。しかしポリ  
L-リジン、テ  
トラ-L-リジンなどが生成する。

またフィブリン平板では強力に溶解し溶解円を形成する。

#### 他の蛋白分解酵素との比較

カゼインを基質として、トリブシン、ローキモトリブシン、ペプシン、プロナーゼ、パバインおよび本酵素の活性を比較し次の結果を得た。なお、トリブシンの活性を1としたときの比で示した。

トリブシン 1

5

6

α-キモトリプシン	1.78
ペプシン	1.41
プロナーゼ	0.68
パパイン	0.71
本酵素	4.43

\*い酵素である。また至適 pHが8~9であり、エラスターゼ活性はほとんどなく、分子量は24000であり、その他耐熱性、蛋白分解力などについてもモリハララの一連の酵素とは、明らかに異なる。以上詳述した様に本発明酵素は、新規なプロテアーゼであるが、次にシュードモナス・エルギノーザの生産する前記モリハララの酵素（中性、セミアルカリ性、アルカリ性プロテアーゼをそれぞれプロテアーゼⅠ、Ⅱ、Ⅲとする）と10の相違を一括表示して、さらに本酵素の新規性を明らかにする。

## 分子量

セファデックスG-75により分子量の測定を行ない24000の値を得た。

以上詳述した様に本酵素は、耐熱性、蛋白分解力などにおいて優れた性質を有し、利用価値の高

プロテアーゼ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	本 酵 素
① 至適 pH	6.5	7~8	10.0	8.5
② 酵素生産の有無				
A. 天然培地	有	有	無	有
B. 合成培地	有	有	有	無
③ 耐熱性	—	70℃	60℃	65℃
④ pH 安定性	—	pH 5~11	pH 5~9	pH 6~10
⑤ 基質特異性				
A. カゼイン	+	+	+	+
B. アルブミン	不明	+	+	+
C. ヘモグロビン	"	+	+	+
D. ケラチン	"	—	不明	+
E. コラーゲン	"	—	—	—
F. エラスチン	"	+	—	+
⑥ 分子量	不明	39500	48400	24000

以上から明らかな如く、本酵素は、従来のシュ

ードモナス・エルギノーザの生産するプロテアーゼとは、明らかに異なる新規なプロテアーゼである。すなわちプロテアーゼⅠは、至適 pH6.5の、いわゆる中性プロテアーゼであり、本酵素は、至適 pHが8.5でありこれとは明らかに異なる。またプロテアーゼⅡは、天然培地では生産されず、かつその分子量は48400であり本酵素は、天然培地で生産され、しかも分子量は24000であることから、これともやはり異なるものである。

またプロテアーゼⅢは、至適 pHが7~8であり、本酵素は、8.5である点で異なり、そのうえさらに pH安定性についても、プロテアーゼⅢは pH5でも70%の活性を保っているが、本酵素の場合は、pH5以下では急激に失活することが第2図より明らかである。なおまたプロテアーゼⅢはケラチン分解活性がないが、本酵素は、ケラチン分解力をもっており、そのうえなお分子量もプロテアーゼが39500であるのに反し、本酵素は24000でありこの点においても明らかに異なる。

るものである。

以上詳述した様に本発明により得られるプロテアーゼB-5は、従来のシュードモナス・エルギノーザの生産するプロテアーゼとは、明らかに異なる新規なプロテアーゼである。

なお本発明に使用するB-5株は、本発明者らにより新たに分離されたもので、その菌学的性状を詳述する。

シュードモナス・エルギノーザB-5株の菌学的性状

本菌の同定はBergeys Manual seventh editionによつた。

本菌はrigidで桿状で、Polar flagellaにて運動し、さらに光合成色素をもたず、水溶性の緑色色素を生成するのでPseudo monadineaであり、さらに細胞が培養基に固着せず、生理学的にOxidativeであることよりPseudomonadaceaeとなる。またグルコースを酸化的に分解し、エタノールで酢酸を生成せず水溶性色素が培地中に拡散しかつ緑色であることよりPseudomonas であることがわかる。さらにゼラチン培養基に生育し、ゼラチン液化力が強く、鞭毛(鞭毛染色による)であり42℃に容易に生育する。

次に本菌の形態学的、生理学的性状を示す。

1. 桿菌で、単独又は双連で存在し  
monotrichous でありグラム陰性である。大きさ0.6~1.0×2.5ミクロン
2. ゼラチン平板培地：黄緑色で、急速に液化。
3. ゼラチン高層培地：急速に液化し、淡黄緑色を呈す。
4. 肉汁寒天平板培地：拡散性あり、周辺は透明、培地は緑色。
5. 肉汁寒天斜面培地：培地は緑色から黒褐色に変る。
6. 肉汁培地：厚膜を形成し、沈渣多く、黄緑色から赤褐色に変わり、フェナジンカルボン酸を生成。
7. リトマスミルク：急速にペプトン化しリトマス還元し、アルカリ性を呈す。
8. バレイショ培地：黄緑色から黒褐色に変る。
9. インドール：少量生成。
10. 硝酸塩の還元：硝酸塩を還元し、窒素ガス生成。
11. 各種糖の発酵性：グルコース、フラクトース、

ガラクトース、アラビノース、マルトース、ラクトース、シユクロローズ、デキストリン、イヌリン、グリセリン、マンニトール、ズルシトールはいずれも発酵性なく、グルコースガラクトース、アラビノースからは酸を生成する。

以上により本菌株はシュードモナス・エルギノーザと同定した。

次に実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明する。

#### 10 実施例 1

グリコース1%、肉エキス1%、ポリペプトン1%、食塩0.5%からなる液体培地(PH 7.0)2000mlを滅菌後予め同組成の培地に24時間培養したB-5株の培養液20mlを無菌的に接種する。これをロータリーシェイカー(186

回転/分)上にて、23~30℃で、48時間培養する。培養終了後遠心分離(11000回転/分)で菌体を除去し、その上清液9mlに、硫酸を加えて、飽和度0.6とする。

ついで、遠心分離により、沈渣を集め0.05Mグリシン-苛性ソーダバッファー(PH 8.6)にとかして、900mlとし、これを0.001M-グリシン-苛性ソーダバッファーに対し、20時間透析し、透析内液950mlを得る。これに95mlのアセトンを加え、少量の塩化カルシウムを添加して、ムチン様物質を除去する。この上清液1050mlにアセトンを加えて、75%濃度とし、生成した沈渣を遠心分離で集め、0.05Mグリシン-苛性ソーダバッファーに対し、3日間透析する。透析内液300mlを凍結乾燥して、粉末3.2gを得る。本酵素の活性は233単位/mgである。

#### 実施例 2

実施例1と同様にして得たプロテアーゼB-52.0gを0.05Mトリスバッファー(PH 8.6)100mlにとかし、0~5℃で一液放置すると、結晶が析出する。これを遠心分離で採取し、母液はさらに濃縮して放置することにより両者併せて、結晶酵素6.2mgが得られる。この酵素の活性は3980単位/mgである。本品の性状は、本文中に記載したものそれと一致する。

#### ⑤特許請求の範囲

1 シュードモナス・エルギノーザB-5株を培養し、その培養液から新規なプロテアーゼB-5を採取することを特徴とする新規なプロテアーゼ

のB-5製造法。

④引用文献

特 公 昭39-26054

特 公 昭40-27315

特 公 昭41-155

